

**EINFACHE QUANTITATIVE BESTIMMUNG
DER GLYKOSAMINOGLYKANE IN DER
SYNOVIALFLÜSSIGKEIT MIT PSEUDOISOCYANIN**

Friedrich Manz

1981

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München
(Direktor: Professor Dr. med. H. Spiess)

EINFACHE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER GLYKOSAMINOGLYKANE
IN DER SYNOVIALFLÜSSIGKEIT MIT PSEUDOISOCYANIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt
von
Diplomchemiker Friedrich Manz
aus München

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München



Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.-J. Suschke
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. H. Spiess
Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 5. 11. 1981

Inhaltsübersicht

	Seite
1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2. BESTIMMUNG DER GLYKOSAMINOGLYKANE IN DER SYNOVIALFLÜSSIGKEIT DURCH PSEUDO-ISOCYANIN-POLYANIONEN-AGGREGATE	5
2.1. Physiko-chemische Grundlagen	5
2.1.1. Definition der Glykosaminoglykane (GAG)	5
2.1.2. Metachromatische Reaktion des Pseudo-isocyanins (PIC) mit Polyanionen	8
2.2. Material und Methode	14
2.2.1. Verwendete Geräte und Substanzen	14
2.2.2. Abtrennung der Glykosaminoglykane aus der Synovialflüssigkeit	15
2.2.3. Ultrafiltration	18
2.2.4. Photometrische Bestimmung der Pseudo-isocyanin-Polyanionen-Aggregate	20
2.2.5. Eichkurve	22
2.2.6. Wiederfindung	26
3. DISKUSSION	28
4. ZUSAMMENFASSUNG	30
5. LITERATURVERZEICHNIS	31

1. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

PARACELSUS, eigentlich Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim (1493 - 1541), kommt das Verdienst zu, als erster das Vorhandensein einer zähen Flüssigkeit in den Gelenkshöhlen bemerkt zu haben (24, 34). Die moderne biochemische Analytik der Synovialflüssigkeit hat neue Einblicke in das synoviale System - eine Funktionseinheit von Gelenkknorpel, Gelenkkapsel und Synovialflüssigkeit - erbracht (29). Über ihre Entstehung sind in der Vergangenheit zahlreiche Theorien entwickelt worden. Nach den Untersuchungen der letzten zwei Jahrzehnte (17) sind folgende drei Punkte als gesichert zu betrachten:

- Die Synovialflüssigkeit ist ein Dialysat des Serums für niedermolekulare Bestandteile.
- Makromolekulare Bestandteile, besonders Proteine, gelangen nur zum Teil durch Gelfiltration des Serums durch die hyaluronathaltige Synovialdeckschicht (lining cells) in die Synovialflüssigkeit.
- Spezifisches Sekretionsprodukt der angrenzenden Synovialzellen ist Hyaluronat, vor allem für die Viskosität und Viskoelastizität der Synovialflüssigkeit verantwortlich.

Auch in der Synovialflüssigkeit können sich Entzündungsprozesse abspielen, also all jene Reaktionen der Bindegewebszellen auf irgendwelche Noxen, die schließlich zur Bildung neuer Gewebsgrundsubstanz (durch Fibroblasten) führen (14, 15, 16). Der Mechanismus, der die ruhenden Fibroblasten aktiviert, ist noch nicht genau erforscht (57). FASSBENDER (23) vermutet, daß Lymphokine der T-Zellen die Proliferation, wie auch die Aktivierung der Bindegewebszellen, bewirken.

Die Applikation antiphlogistischer Pharmaka verursacht eine Abnahme der Glykosaminoglykansynthese und -sekretion. Eine Reihe von Untersuchungen war nötig, um diesen Wirkungsmechanismus verstehen zu können. So konnte GOGGINS (27) nachweisen, daß c-AMP die Synthese sulfatierter Mukopolysaccharide in Fibroblasten zu steigern vermag. Ähnliches beobachtete CASTOR (15) an menschlichen Synovialzellen. PETERS (52) und SCHÖNHÖFER (62) konnten den Nachweis erbringen, daß die Glykosaminoglykansekretion von Fibroblasten durch eine Steigerung der c-AMP-Bildung - durch Prostaglandin E_1 , Bradykinin oder 17- β -Oestradiol induzierbar - verstärkt werden konnte.

Untersuchungen über den Einfluß nichtsteroidaler Antiphlogistika (7 - 10, 20, 38, 51, 66, 86) ergaben verschiedene Angriffspunkte dieser Pharmaka im Synthese- und Sekretionsverhalten der Glykosaminoglykane.

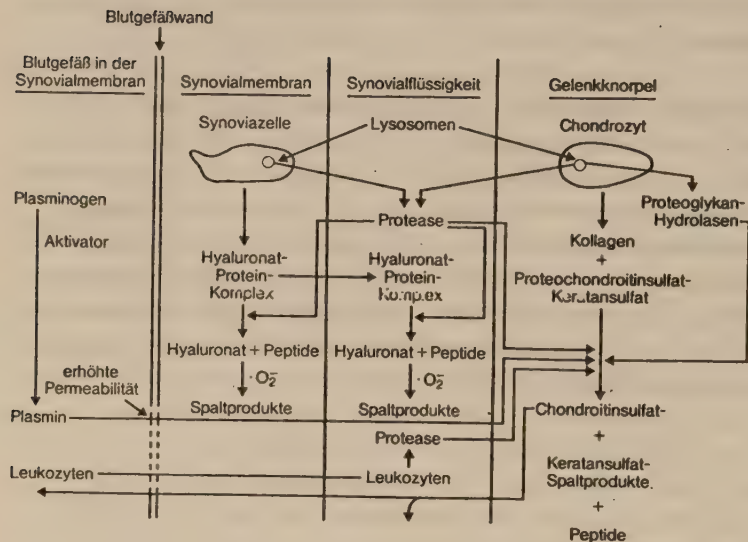
Bei chronisch-entzündlichen Gelenkserkrankungen kommt es in den verschiedenen Kompartimenten des synovialen Systems zum Abbau von Hyaluronat und der Proteoglykane. Die Zerstörung des Gelenkknorpels erfolgt vorwiegend durch lysosomale Enzyme, die aus der Lysosomenfraktion von Leukocyten, Chondrocyten und Zellen der Synovialmembran stammen. An der Depolymerisation des Hyaluronats sind außer lysosomalen Enzymen auch Superoxidradikale (28, 43) von großer Bedeutung. Diese, bei zahlreichen enzymatischen Vorgängen nachweisbaren intermediären Reduktionsprodukte (26), dismutieren ihrerseits zu molekularem Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Das Enzym Superoxiddismutase erhöht die spontane Dismutationsrate wesentlich (58), womit ein niedriges steady-state-level an freien O_2^- -Radikalen aufrechterhalten wird. Wird diese Dismutationsfähigkeit überstiegen, wirken die

Superoxidradikale zytotoxisch, besonders dann, wenn sie extrazellulär auftreten, wie dies bei nahezu allen entzündlichen Reaktionen der Fall zu sein scheint (44, 53).

Als Erythrocytase erstmals im Jahre 1939 von MANN (42) beschrieben, wird die Superoxiddismutase zur Zeit unter dem generic name Orgotein (25) klinisch erprobt, um die O_2^- -Radikale abzubauen und so die biochemische Entgleisung abzufangen.

Bisherige Methoden zur Bestimmung der Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit (4, 6, 39, 41, 67, 68, 69) sind entweder relativ ungenau oder kompliziert und zeitaufwendig. Die vorliegende Arbeit soll versuchen, eine neue, relativ einfache Methode zu entwickeln, um die Konzentration der Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit zu erfassen, einerseits für diagnostische Zwecke und andererseits, um den Therapieverlauf bei medikamentöser Behandlung verfolgen zu können.

Abb. 1: Pathobiochemische Mechanismen, die bei chronisch-entzündlichen Gelenkserkrankungen zum Abbau von Hyaluronat und der Proteoglykane in den verschiedenen Kompartimenten des synovialen Systems führen (aus 29)



2. BESTIMMUNG DER GLYKOSAMINOGLYKANE IN DER SYNOVIAL- FLÜSSIGKEIT DURCH PSEUDOISOCYANIN-POLYANIONEN- AGGREGATE

2.1. Physiko-chemische Grundlagen

2.1.1. Definition der Glykosaminoglykane (GAG)

Hexosaminhaltige Polysaccharide tierischen Ursprungs wurden erstmals 1938 von MEYER (45) als "Mucopolysaccharide" bezeichnet. Dabei sollte die Vorsilbe "muco" auf die Beziehung dieser Substanzen zu den physiologischen Schleimstoffen hindeuten. Neuerdings hat sich in der Literatur der synonyme Ausdruck "Glykosaminoglykane" durchgesetzt.

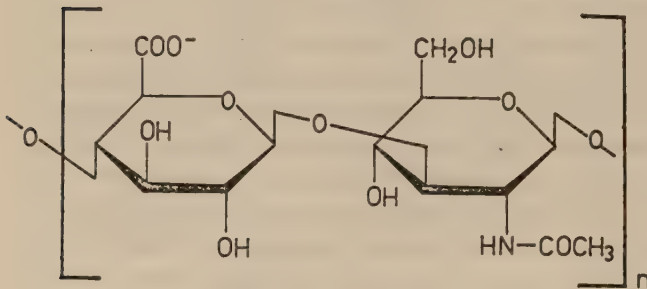
Neben der schon beschriebenen Bedeutung der Glykosaminoglykane als "Gelenkschmiere" (Paracelsus: $\sigma\upsilon\gamma$ und ovum "mit Eistoff"), ihrer Veränderung bei chronisch-entzündlichen und degenerativen Erkrankungen der Gelenke, wurde erstmals im Jahre 1952, durch chemischen Nachweis der Speicherung dieser Substanzen in Organen (z.B. Leber) und Meningen von Patienten mit Morbus Hurler, von BRANTE (11) eine Verbindung zu diesen genetisch bedingten Krankheiten, den Mucopolysaccharidosen, hergestellt. Inzwischen gilt eine erhöhte Ausscheidung von Glykosaminoglykanen im Urin als Charakteristikum und Frühsymptom dieser Erkrankungen (54).

Im Sinne einer genauen Klassifikation (32) werden die sauren Mucopolysaccharide als Untergruppe der Glykosaminoglykane aufgefaßt, von denen sie sich durch ihren Gehalt an Estersulfat und/oder Uronat abheben.

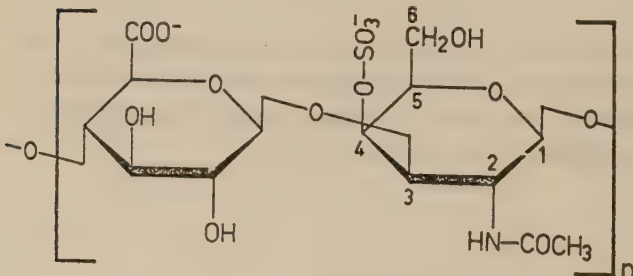
Die Glykosaminoglykane sind proteinfreie Polysaccharide, aufgebaut aus langen, linearen Ketten polymerer Disaccharideinheiten, welche sich aus acetylierten Aminosuckern und D-Galaktose bzw. D-Glucuronat, seltener auch anderen Hexuronaten, zusammensetzen (3). Die Glykosaminoglykane ihrerseits sind der großen Gruppe der Heteroglykane zuzuordnen, worunter polymere Kohlenhydrate aus zwei oder mehreren unterschiedlichen Monosaccharideinheiten zu verstehen sind.

Abb. 2: Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit, ihre Strukturformeln und Molekulargewichte (70)

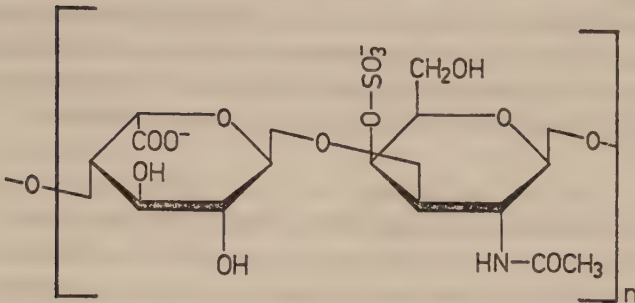
- a) Hyaluronat (Hauptbestandteil, ca. 95 %)
= Glucuronat + N-Acetyl-Glucosamin
MG 100.000 - 1.000.000



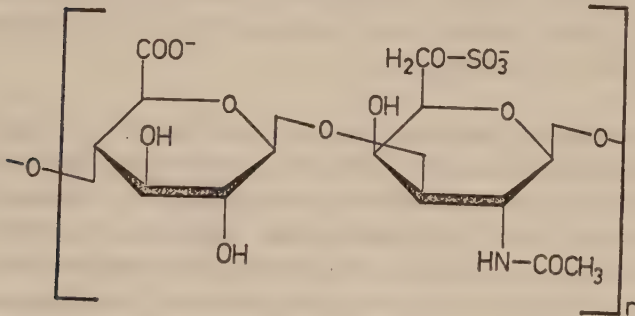
- b) Chondroitinsulfat A = Chondroitin-4-sulfat
= Glucuronat + N-Acetyl-Galaktosamin-4-sulfat
MG 50.000 - 100.000



- c) Chondroitinsulfat B = Dermatansulfat
= Iduronat + N-Acetyl-Galaktosamin-4-sulfat
MG 50.000 - 100.000



- d) Chondroitinsulfat C = Chondroitin-6-sulfat
= Glucuronat + N-Acetyl-Galaktosamin-6-sulfat
MG 50.000 - 100.000



Der Anteil der Chondroitinsulfate beträgt ca. 5 % des Gesamtglykosaminoglykangehalts in der Synovialflüssigkeit (65).

Sulfatierungs- und Acetylierungsgrad weichen oft vom dargestellten Idealfall ab (46, 47, 55, 76, 80, 85), da die Glykosaminoglykane in vivo als Hybride vorliegen (71).

2.1.2. Metachromatische Reaktion des Pseudoisocyanins (PIC) mit Polyanionen

Zahlreiche Carboxylatgruppen der Hexuronsäuren sowie Sulfatgruppen verleihen den Glykosaminoglykanen alle Merkmale hochgeladener Polyanionen. Diese Eigenschaft erlaubt ein Verfahren zu ihrer schnellen, quantitativen Erfassung.

SCHEIBE (2, 60, 61) und JELLEY (35, 36) hatten erstmals darauf hingewiesen, daß bestimmte Farbstoffe, besonders die Pseudoisocyanine, reversible Aggregate bilden können. Dabei treten die π -Elektronensysteme der einzelnen Moleküle in Wechselwirkung, wodurch sich das UV-Absorptionsspektrum des betreffenden Farbstoffes verändert. Diese Änderung ist bereits mit bloßem Auge sichtbar, da sich die Farbe der Lösung von rot nach violett hin verschiebt. Dieses Phänomen bezeichnet man als Metachromasie. Diesen Vorgang hatte schon EHRLICH (22) im Jahre 1877 bei der Anfärbung von Geweben beobachtet.

Die Aggregationstendenz der kationischen Pseudoisocyaninmoleküle läßt sich durch das Zusammenbringen mit den polyanionischen Glykosaminoglykanen induzieren bzw. verstärken. Dies geschieht durch die dann wirksam werdenden elektrostatischen Anziehungskräfte. Die Farbstoffmonomeren reichern sich um den Strang des polyanionischen Biopolymeren an, welcher sozusagen als bewegliche Matrizie dient und so die Wahrscheinlichkeit des Zueinandertretens der Chromophoren und ihrer Vereinigung zu einem Aggregat wesentlich erhöht.

Innerhalb des Polyanionengerüsts der Glykosaminoglykane ist die Lokalisation der negativ geladenen Gruppen relativ

genau festgelegt. Die freie Drehbarkeit um die C-O-S-Einfachbindung verhindert aber eine exakte Fixierung des Abstands zweier negativ geladener Gruppen. Die Aggregatstruktur der Farbstoffmoleküle ist daher nach Kontakt mit polyanionischen Lösungen als Kompromißzustand zwischen ihrer ungestörten Form und der Struktur des Polyanions anzusehen.

Die UV-Spektroskopie veranschaulicht den chromotropen Effekt.

Abb. 3: UV-Spektren von Pseudoisocyanin (PIC)-Hyaluronat
(hy)-Mischungen

- ϵ = Extinktionskoeffizient
 $\tilde{\nu}$ = Wellenzahl [cm^{-1}]
 λ = Wellenlänge [nm]

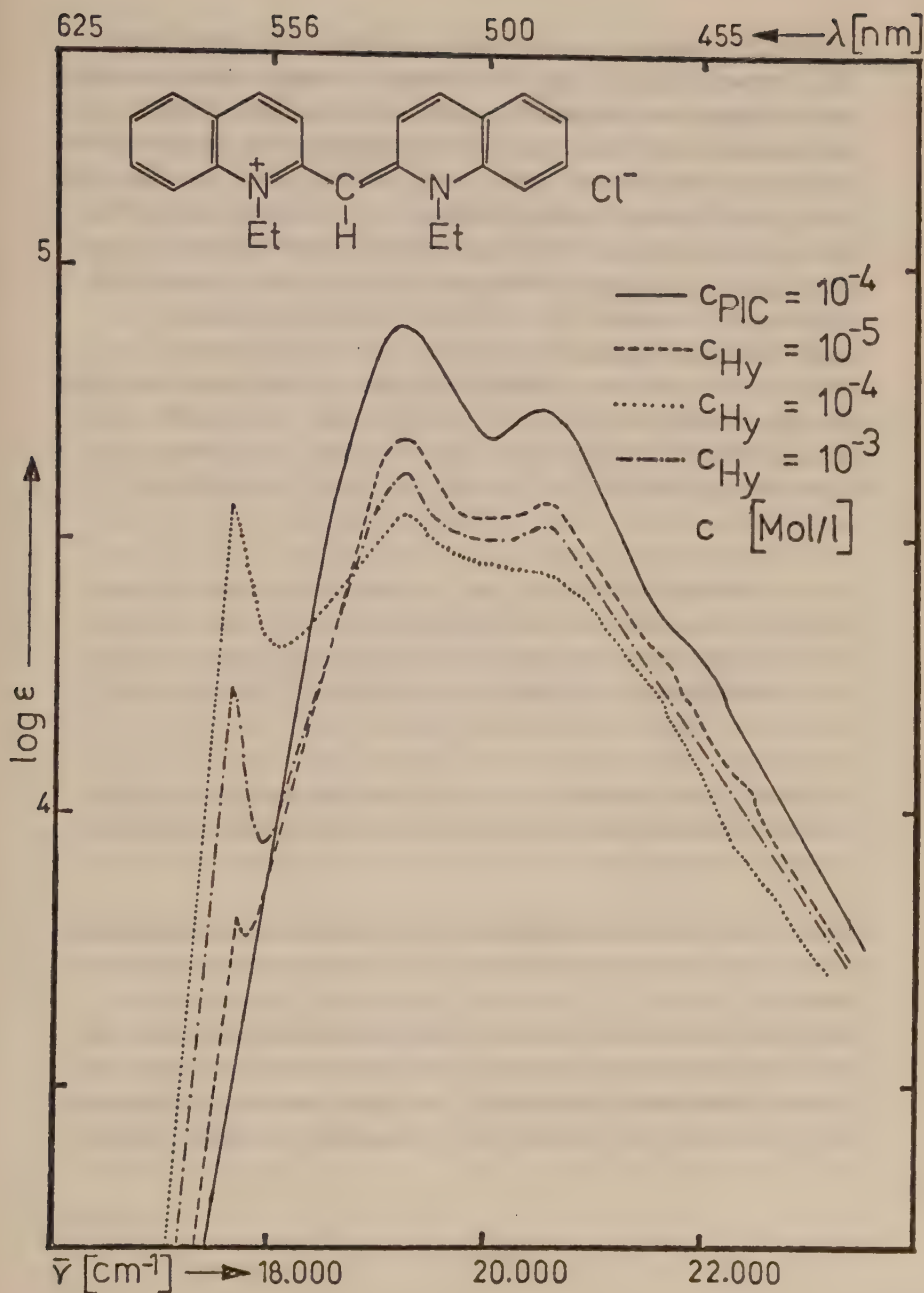


Abbildung 3 zeigt das UV-Absorptionsspektrum einer wässrigen Lösung von reinem N,N-Diethyl-Pseudoisocyanin-Chlorid. Bei stufenweiser Zugabe von gelöstem Hyaluronat ändert sich das Spektrum in charakteristischer Weise. Das Extinktionsmaximum des Monomeren bei $\tilde{\nu} = 19.200 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 521 \text{ nm}$) wird zusehends kleiner. Dafür erscheint im längerwelligen Bereich des Spektrums ein ausgeprägtes Maximum. Dessen Lage und Intensität hängen offensichtlich von der zugegebenen Menge des Polyanions ab. Für das Erscheinen dieser "J-Bande" ist das Aggregationsverhalten des Farbstoffs verantwortlich. Im vorliegenden Beispiel findet sich das Maximum der J-Bande bei einer Wellenzahl von $\tilde{\nu} = 17.650 \text{ cm}^{-1}$. Nach GSCHWIND (30) variiert es - je nach Chromotrop - zwischen $\tilde{\nu} = 17.200 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 581 \text{ nm}$) und $\tilde{\nu} = 17.700 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 565 \text{ nm}$).

Der Konzentrationsanstieg des Glykosaminoglykans hat anfänglich eine Intensitätszunahme der J-Bande zur Folge, entsprechend einer Zunahme der Aggregation. Steigt jedoch die Konzentration an (Hyaluronat über 10^{-3} Mol/l), so sinkt die Aggregationsbildung wieder ab.

Systematische Untersuchungen einiger Autoren (18, 30) haben folgende, für die vorliegende Arbeit relevante, Ergebnisse erbracht:

Nicht nur die Art des Polyanions, sondern auch seine Konzentration kann für die Lage der J-Bande mitverantwortlich sein.

Dies ist durch die variable Sekundärstruktur der Matriz e bei höheren Konzentrationen zu erklären. Zuerst liegt eine relativ gestreckte Fadenform vor (31), welche bei steigender Konzentration in eine Art Knäelform übergeht, da die

zunehmende Kompensation der negativen Gruppen durch die Kationen eine verringerte gegenseitige Abstoßung der negativen Ladungen längs der Polymerstränge zur Folge hat. Auch werden die negativen Gruppen durch die Farbstoffkationen neutralisiert. Diese Strukturänderung des Chromotrops bewirkt aber eine Änderung der Aggregatstruktur, was in einer Verlagerung der J-Bande sichtbar wird, auch in einer Abnahme deren Intensität.

Lage und Form der J-Bande bleiben jedoch gegenüber einer Änderung der die Farbstoffkationen neutralisierenden Anionen im wesentlichen unbeeinflusst. Eine Zugabe von anorganischen Salzen oder von Protaminen aber macht die Aggregation rückgängig, da die Kationen des Elektrolyten mit den Kationen des Pseudoisocyanins um die negativen Ladungen am Biopolymerenstrang des Glykosaminoglykans konkurrieren.

SUSCHKE und Mitarbeiter (71 - 79, 83) nutzten die Existenz der Metachromasie zur Entwicklung einer Methode, um die Glykosaminoglykane im menschlichen Urin wie auch im Fruchtwasser zu bestimmen. Dabei werden die säulenchromatographisch gewonnenen Fraktionen gegen Protamin titriert, wobei die J-Bande als Indikator, der Moment ihres Verschwindens als Äquivalenzpunkt, benützt wird.

Es soll nun versucht werden, ein ähnlich einfaches Verfahren zu entwickeln, um die Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit bestimmen zu können. In erster Linie deshalb, um den Verlauf chronisch-entzündlicher wie degenerativer Gelenkserkrankungen, wie auch die Wirkung von Pharmaka auf die Konzentration von Glykosaminoglykanen verfolgen zu können.

2.2. Material und Methode

2.2.1. Verwendete Geräte und Substanzen

- a) AMICON-Rührzelle, Modell 12, max. Innenvolumen 10 ml.
- b) DIAFLO-Ultrafiltrationsmembran Typ UM 2, Ø 25 mm.
- c) BECKMANN Spectrophotometer, Modell 24.
- d) Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid, reinst, SERVA, Heidelberg, Nr. 37192.
- e) Pronase aus *Streptomyces griseus*, reinst (9 U/mg, 100 000 PUK-E/mg), SERVA, Heidelberg, Nr. 33635.
- f) Trypsin aus Rinderpankreas (ca. 40 U/mg), 2x cryst., SERVA, Heidelberg, Nr. 37260.
- g) 5-Sulfosalicylsäure p.a., SERVA, Heidelberg, Nr. 35706.
- h) N,N-Diethyl-Pseudoisocyanin-Chlorid, RIEDEL DE HAËN, Hannover, Nr. 28537.
- i) Hyaluronsäure K-salz, liophyl. reinst, SERVA, Heidelberg, Nr. 25130.

2.2.2. Abtrennung der Glykosaminoglykane aus der Synovialflüssigkeit

Die quantitative Bestimmung der Glykosaminoglykane gliedert sich in drei Teilschritte:

- Abtrennung aller, eventuell die Messung störender, Fremdstoffe
- Herstellung des Glykosaminoglykan-Pseudoisocyanin-Gemisches
- eigentliche photometrische Messung

Zu diesem Zweck wurde die Synovialflüssigkeit von acht Patienten, die folgende Alters- und Geschlechtsverteilung aufwiesen, gepoolt:

vier männlich; Durchschnittsalter: $31,5 \pm 9,3$ Jahre
(22 J., 28 J., 32 J., 44 J.)

vier weiblich; Durchschnittsalter: $33,0 \pm 10,2$ Jahre
(26 J., 27 J., 31 J., 48 J.)

Durchschnittsalter der Gesamtstichprobe: $32,25 \pm 9,1$ Jahre

Alle acht Patienten mußten folgende Auswahlkriterien erfüllen:

- Sie durften nicht unter Cortisontherapie stehen,
- sie durften vorher keine intraartikuläre Injektion erhalten haben,
- der Gelenkerguß mußte traumatischer Genese sein (degenerative und chronisch-entzündliche Erkrankungen wurden anamnestisch ausgeschlossen),
- das Kniegelenkspunktat durfte makroskopisch keine Blutbeimengung erkennen lassen.

Die Gelenkspunktion erfolgte unter streng aseptischen Bedingungen, da bakterielle DNS ebenfalls polyanionische

Strukturen aufweist, die die metachromatische Reaktion stören könnten (71). Auch ist es wünschenswert, die Synovialflüssigkeit sofort aufzuarbeiten; ist dies nicht möglich, sollte sie bei -18°C gelagert werden, da sich bei längerem Stehen viele Parameter wie z.B. die Viskosität (fortschreitende Depolymerisation!) ändern.

Zur Aufarbeitung wird 1 ml der Synovialflüssigkeit zunächst mit 1 ml Trispuffer-HCL (0,1 M, pH 7.4) versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von ca. 0,3 mg Trypsin. Das Gemisch wird für drei Stunden bei einer Temperatur von 37°C im Schüttelwasserbad belassen. Das verwendete Trypsin stammt aus Rinderpankreas und besitzt eine Aktivität von ca. $40\ \mu/\text{mg}$ (MG ca. 23.800). Es hydrolysiert die Peptidbindungen an Carbonylgruppen von Arginin, Lysin und Ornithin (37, 49, 63). Da das Trypsin eine sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit aufweist, genügt eine Reaktionszeit von drei Stunden.

In einem zweiten Schritt wird als unspezifische Protease das Enzym Pronase (ca. 0,3 mg) (gewonnen aus *Streptomyces griseus*) mit einer Aktivität von ca. 8 DMC-U/mg eingesetzt (40, 48, 59, 82). Diese Protease katalysiert, wie andere unspezifische Proteasen aus Bakterien (z.B. Subtilisin), die Hydrolyse der Peptidbindungen relativ langsam. Deshalb ist es nötig, eine Reaktionszeit von zwölf Stunden einzuhalten (am besten läßt man die Reaktion über Nacht laufen). Die Bedingung ist ebenfalls eine Temperatur von 37°C (Schüttelwasserbad).

Nach Ablauf der zweiten Hydrolyse werden 0,5 ml 5-Sulfosalicylsäure (10-prozentig) zugesetzt, um etwa noch vorhandenes Protein zu fällen. Die als Kationen vorliegen-

den Proteine bilden mit der zugegebenen Säure unlösliche Salze, was zur Ausflockung (Denaturierung) führt. Dabei werden auch die im leichten Überschuß zugegebenen Proteasen (Trypsin, Pronase) mitgefällt.

Das so erhaltene Reaktionsgemisch (ca. 2,5 ml) wird nun fünfzehn Minuten ($U = 3000/\text{min}$) zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und, um wieder annähernd neutrale pH-Verhältnisse herzustellen, mit 0,8 ml einer 1 n NaOH-Lösung versetzt. Der neutrale pH-Wert ist zur Schonung der Ultrafiltrationsmembran nötig.

Tab. 1: Tabellarische Übersicht über die notwendigen Reaktionsschritte zur Abtrennung der Glykosaminoglykane aus der Synovialflüssigkeit

1. Schritt: 1 ml Synovialflüssigkeit + 1 ml Tris-Puffer-HCl (0,1 molar, pH 7,4)
2. Schritt: Zugabe von 0,3 mg Trypsin (drei Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad)
3. Schritt: Zugabe von 0,3 mg Pronase (zwölf Stunden bei 37 °C im Schüttelwasserbad)
4. Schritt: Zugabe von 0,5 ml 10-prozentiger Sulfosalicylsäure
5. Schritt: Fünfzehn Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugieren
6. Schritt: Überstand mit 0,8 ml 0,1 n NaOH versetzen
7. Schritt: Einbringen dieser Lösung in die Rührzelle zur Ultrafiltration.

2.2.3. Ultrafiltration

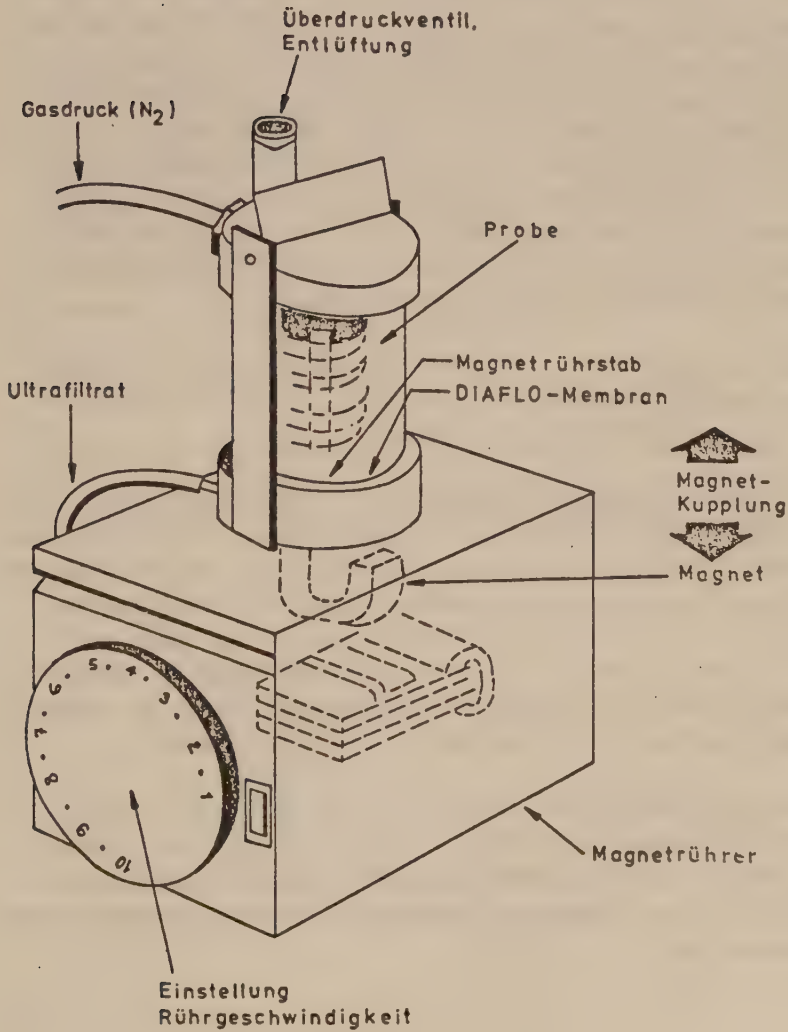
Das Molekulargewicht der Glykosaminoglykane beträgt 15 000 bis mehrere Millionen (13, 81). Da die, wie oben angegeben behandelte Synovialflüssigkeit keine weiteren Makromoleküle dieser Größenordnung enthalten dürfte, sollte die Ultrafiltration durch semipermeable Membranen adäquater Porengeometrie ein genügend genaues Abtrennungsverfahren sein (5, 56). Aus diesen Gründen fiel die Wahl auf die Diaflo-Membran UM2, kombiniert mit einer Amicon-Rührzelle (1) (vgl. Abb. 4).

Während der Magnetrührer die Konzentrationspolarisation senkt, wird die Flüssigkeit in der Kammer samt anorganischen Salzen und kleineren organischen Molekülen unter einem Druck von 4 atm durch die Membran gepreßt, bis endlich ein visköser, schleimähnlicher Rückstand verbleibt.

Die durchgepreßte Flüssigkeit zeigt keine Metachromasie mehr, ein Zeichen dafür, daß bei der Filtration keine Glykosaminoglykane verloren gehen.

Der Rückstand wird zweimal mit je 2 ml aqua bidest. gewaschen und schließlich in 10 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die so gewonnene klare Glykosaminoglykanlösung bildet die eine Komponente für die sich anschließende Photometrie.

Abb. 4: Schematische Skizze der Apparatur zur Abtrennung der Glykosaminoglykane aus der Synovialflüssigkeit mittels Ultrafiltration



2.2.4. Photometrische Bestimmung der Pseudoisocyanin-Polyanionen-Aggregate

Zu der so gewonnenen Glykosaminoglykanlösung wird als zweiter Bestandteil eine N,N-Diethyl-Pseudoisocyanin-Chlorid-Lösung definierter Konzentration ($c = 1.67 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) gegeben. Bei diesem Farbstoffgehalt tritt keine Eigenaggregation des Pseudoisocyanins auf, wie sie bei höheren Konzentrationen zu erwarten wäre (30), und die das Meßergebnis durch Überlagerung anderer J-Banden verfälschen würde. Diese Farbstoffmenge reicht aber aus, um eine genügende Aggregationsreaktion innerhalb von fünf Minuten zu erreichen. Dies ist daran erkennbar, daß nach dieser Zeit noch immer monomerer Farbstoff nachweisbar ist.

Bei Verwendung des analogen Jodids würde sich das Problem der Eigenaggregation nicht stellen, jedoch ist dieses Derivat nicht käuflich zu erwerben.

Für derart verdünnte Lösungen reinen Farbstoffs behält das Lambert-Beer'sche Gesetz $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ seine volle Gültigkeit. Somit kann die instabile Konzentration des Pseudoisocyanins täglich neu eingestellt werden, indem man einige Tropfen einer ca. $5 \cdot 10^{-4}$ molaren Mutterlösung auf die Norm von $E = 1,300 \pm 0,06$ ($c = 1.67 \cdot 10^{-4}$ Mol/l) zugibt. Es empfiehlt sich dringlichst, Pseudoisocyaninlösungen stets im Dunkeln aufzubewahren, da diese sich an Licht zersetzen.

Weiterhin sollte man stets darauf bedacht sein, bidestilliertes Wasser zu verwenden, da selbst Spuren von Elektrolyten den Aggregationsvorgang beeinflussen, auch sollten allzu starke Temperaturschwankungen vermieden werden (Raumtemperatur).

Nach Zusammengeben der einzelnen Komponenten in einem Reagenzglas wird dieses kurz durchgeschüttelt und eine Reaktionszeit von genau fünf Minuten eingehalten. Längere Zeiten ergeben höhere Werte (die komplette Gleichgewichtseinstellung würde zu viel Zeit in Anspruch nehmen).

Je 300 μ l der Glykosaminoglykanlösung und der neu eingestellten Pseudoisocyaninlösung werden in eine Einmalküvette (Schichtdicke $d = 1$ cm) gegeben und in den Strahlengang eines Beckmann Spectrophotometers, Modell 24, eingebracht. Nun ist es besonders wichtig, das Extinktionsmaximum der J-Bande - es sollte zwischen $\tilde{\nu} = 17.700 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 565 \text{ nm}$) und $\tilde{\nu} = 17.500 \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 571 \text{ nm}$) liegen - exakt aufzusuchen, da die J-Bande eine relativ geringe Halbwertsbreite aufweist (siehe Abb. 3).

Die Vergleichsküvette enthält reines aqua bidest.

Der pH-Wert der Meßlösungen schwankte zwischen 6.5 und 7.0. Einige orientierende Messungen ergaben, daß die Meßwerte von diesen geringen Abweichungen nicht verändert wurden.

2.2.5. Eichkurve

Die Extinktionswerte der J-Bande sollten über eine Eichkurve direkt mit dem Glykosamingehalt bekannter Lösungen in Beziehung gesetzt werden, in Anlehnung an die von HARZER und BENZ (33) angegebene Methode.

Zu diesem Zweck wurden 50 mg der gepoolten (s. Kap. 2.2.2.), getrockneten Glykosaminoglykane eingewogen und in 50 ml aqua bidest. gelöst. Drei solcher Stammlösungen wurden hergestellt (Einwaage 50 mg/50 ml Lösung), reihenweise verdünnt und gemessen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 graphisch dargestellt.

Um zu erreichen, daß die Eichkurve durch den Nullpunkt verläuft, wurde die Eigenextinktion des reinen Farbstoffs (1:1 mit Wasser verdünnt) von den Extinktionswerten der J-Bande abgezogen.

Die Eichgerade wurde nach der Methode der kleinsten Quadrate (84) aus den Meßpunkten errechnet (Regressionsgerade).

Als Vertrauensbereich ergaben sich für die Extinktionswerte $E = 0$ bis $E = 1.100$, entsprechend einer Konzentration an Glykosaminoglykan von $c = 0$ bis $c = 0.08$ mg/ml.

Für Konzentrationen überhalb dieses Wertes verläuft die Eichkurve nicht mehr linear, da in diesem Bereich (Molverhältnis Pseudoisocyanin:Disaccharideinheit $\approx 1:1$) die Kristallisation von Glykosaminoglykan-Pseudoisocyanin-Verbindungen einsetzt und so die Werte verfälscht werden.

Als Grundlage der Eichkurve wurde deshalb ein natürliches

Gemisch von Glykosaminoglykanen aus gepoolter Synovialflüssigkeit gewählt, weil Mischungen aus käuflichen Mucopolysacchariden keinesfalls die verschiedenen Kettenlängen, den Sulfatierungsgrad etc. imitieren können.

Tab. 2: Meßpunkte der Eichkurve

GAG = Glykosaminoglykankonzentration

E_J = Extinktion der J-Bande, gemessen bei $\lambda = 570 \text{ nm}$

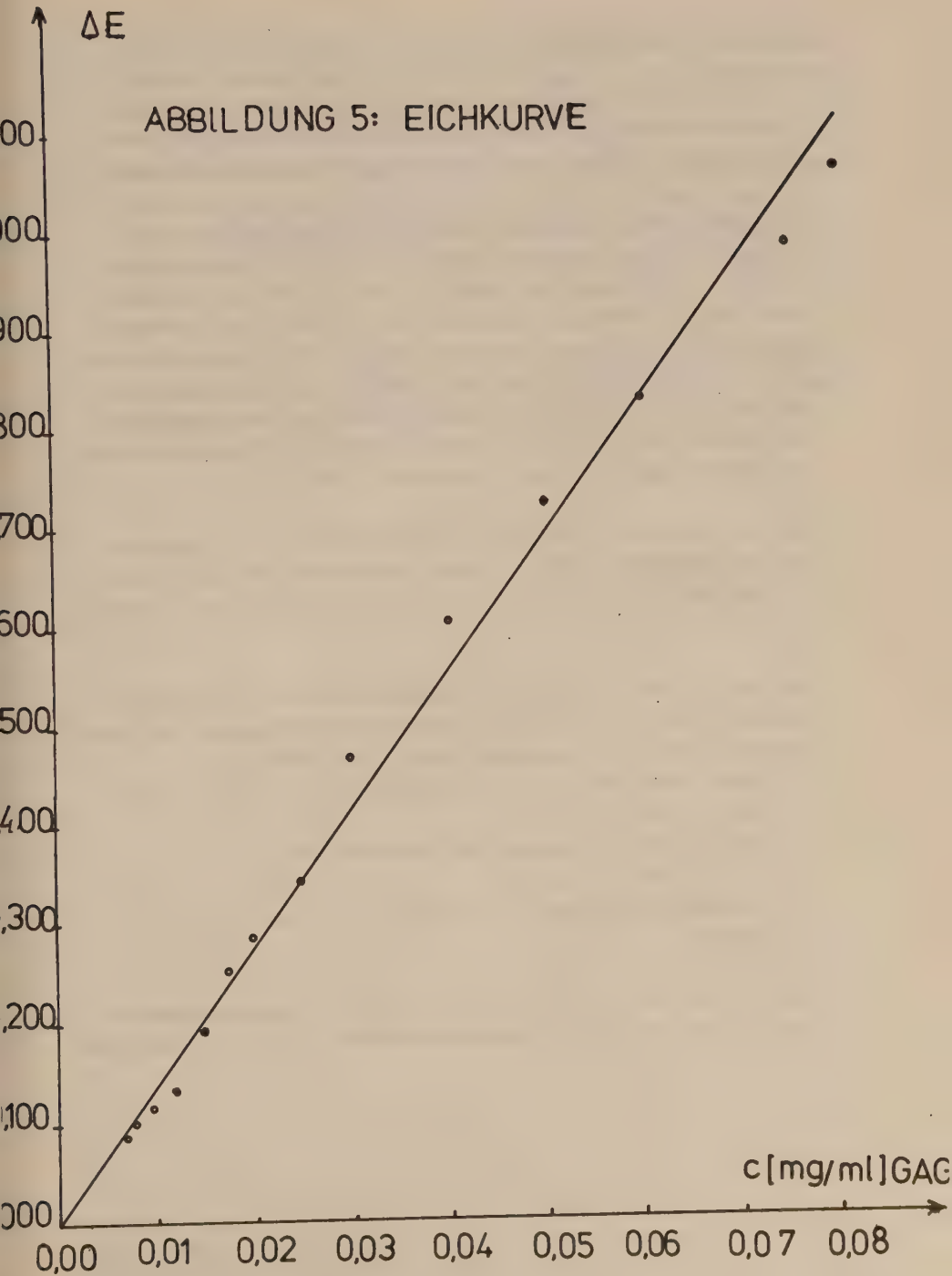
$\bar{E}_J$ = aus drei Einzelmessungen gemittelte Extinktion der J-Bande

E_{Pic} = Extinktion des reinen Farbstoffs (1:1 verdünnt)

$$\Delta E = \bar{E}_J - E_{Pic}$$

Bei der Berechnung der Regressionsgeraden ergaben sich folgende Werte: $\tan \alpha = 1.3860$ $\alpha = 54,19^\circ$

GAG [mg/ml]	E_J	$\bar{E}_J$	E_{PIC}	ΔE
0,007	0,300	0.296	0.208	0.088
	0.290			
	0.298			
0.008	0.320	0.312	0.208	0.104
	0.310			
	0.306			
0.01	0.315	0.326	0.208	0.118
	0.328			
	0.335			
0.012	0.350	0.343	0.208	0.135
	0.339			
	0.340			
0.015	0.405	0.398	0.208	0.190
	0.400			
	0.389			
0.0175	0.468	0.464	0.208	0.256
	0.458			
	0.466			
0.02	0.502	0.504	0.208	0.296
	0.512			
	0.498			
0.025	0.560	0.552	0.208	0.344
	0.546			
	0.550			
0.03	0.690	0.681	0.208	0.473
	0.674			
	0.675			
0.04	0.820	0.817	0.208	0.609
	0.819			
	0.812			
0.05	0.942	0.940	0.208	0.732
	0.933			
	0.945			
0.06	1.030	1.038	0.208	0.830
	1.040			
	1.044			
0.075	1.193	1.200	0.208	0.992
	1.205			
	1.202			
0.08	1.290	1.278	0.208	1.070
	1.281			
	1.263			



2.2.6. Wiederfindung

Um die Effektivität des in Kap. 2.2.2. beschriebenen Abtrennverfahrens der Glykosaminoglykane aus der Synovialflüssigkeit zu bestimmen, wurde folgendes Vorgehen gewählt:

In einer ersten Probe (A) wurde die Synovialflüssigkeit eines Patienten, wie unter Kap. 2.2.2. beschrieben, behandelt. In einer zweiten Probe (B) wurde genauso verfahren, aber unter anfänglichem Zusatz von 200 μ l einer Stammlösung bekannter Konzentration. Beide Proben wurden vollkommen gleich behandelt und anschließend photometrisch vermessen. Die Extinktionen beider Proben wurden anhand der Eichkurve (Kap. 2.2.5.) zu den zugehörigen Konzentrationen an Glykosaminoglykanen in Beziehung gesetzt.

Die so erhaltene Differenz der Konzentrationen wurde mit dem Ausgangswert (200 μ l einer Stammlösung mit $c = 1 \text{ mg}/10 \text{ ml}$) verglichen und die Wiederfindung prozentual berechnet.

Zur Herstellung der Stammlösung dienten die Glykosaminoglykane einer zweiten Gruppe von sechs Patienten, die folgende Alters- und Geschlechtsverteilung aufwiesen:

 drei männlich, Durchschnittsalter: $27,7 \pm 2,7$ Jahre
 (25 J., 28 J., 30 J.)

 drei weiblich, Durchschnittsalter: 35 ± 3 Jahre
 (32 J., 35 J., 38 J.)

 Durchschnittsalter der Gesamtstichprobe: $31,3 \pm 4,7$ Jahre.

Alle Patienten erfüllten die gleichen Voraussetzungen wie in Kap. 2.2.2., die Synovialflüssigkeit wurde ebenfalls ge-

poolt. Die nach der Ultrafiltration gewonnenen Glykosaminoglykane wurden getrocknet und zur Herstellung der Stammlösung eingewogen und in aqua bidest. gelöst.

Dieses Verfahren wurde mit der Synovialflüssigkeit von fünf Patienten durchgeführt; dabei ergaben sich Werte für die Wiederfindung zwischen 83,7 % und 119,5 %, der Mittelwert lag bei $(96,8 \pm 14,4) \%$ (83,7 %, 88,5 %, 90,0 %, 102,3 %, 119,5 %).

Daraus wird ersichtlich, daß das in Kap. 2.2.2. entwickelte Verfahren zur Abtrennung der Glykosaminoglykane aus der Synovialflüssigkeit durchaus effektiv und adäquat ist.

3. DISKUSSION

Um die Validität der verwendeten Meßmethode auf der Basis der metachromatischen Farbreaktion von Pseudoisocyanin mit Glykosaminoglykanen beurteilen zu können, ist zunächst zu klären, ob die angewandte Methode zur Abtrennung der störenden Proteine aus der Synovialflüssigkeit ausreichend ist. Die im ersten Schritt eingesetzte spezifische Protease Trypsin spaltet nur bestimmte Peptidbindungen, dafür aber mit höherer Geschwindigkeit und die Proteine werden in kleinere Peptide und freie Aminosäuren gespalten. Die im zweiten Schritt verwendete Pronase katalysiert als unspezifische Protease die Hydrolyse aller Peptidbindungen, verläuft aber im Vergleich zu spezifischen Proteasen relativ langsam (Wirkdauer: 12 Stunden).

Die anschließende Denaturierung mit Sulfosalicylsäure schließlich fällt die Peptide als unlösliche Salze aus, die durch Ultrafiltration abgetrennt werden können.

Ob und inwieweit die für die Aggregatbildung so wichtigen Sulfatgruppen in Mitleidenschaft gezogen werden, ließe sich nur mit großem experimentellen Aufwand nachweisen.

Auch ist letztlich nicht gesichert, in welcher Größenordnung möglicherweise Bruchstücke der Glykosaminoglykane niedrigeren Molekulargewichts die Ultrafiltrationsmembran passieren und damit verloren gehen (5, 19, 50, 56, 64): Im Ultrafiltrat konnte keine Metachromasie und somit keine Aggregatbildung nachgewiesen werden. Der nach der Ultrafiltration verbleibende Rückstand dürfte also aus einem Glykosaminoglykan-Gemisch hohen Reinheitsgrades bestehen.

Die in zwei Schritten durchgeführte enzymatische Spaltung und die sich anschließende Fällung mit Sulfosalicylsäure sollten alle, eventuell die metachromatische Reaktion störenden, Proteine so weit zerstören, daß sie die Membran bei der Ultrafiltration passieren können.

Unter den zahlreichen in der Literatur beschriebenen Methoden zur quantitativen Analyse der Glykosaminoglykane in Körperflüssigkeiten hebt sich das Prinzip der Kolorimetrie durch einfache, rasche und bequeme Handhabung hervor, bei genügender Exaktheit und Spezifität.

Letztere wird durch die Kombination mit der Ultrafiltration noch erhöht. Ein wesentlicher Vorteil ist, daß schon relativ geringe Volumina (ca. 1 ml) bei weitem ausreichend sind, ein Umstand, der vor allem in der Kinderheilkunde nicht zu unterschätzen ist.

Hinsichtlich der Wahl des Farbstoffs gibt es mehrere Möglichkeiten (z.B. 19, 21, 87), welcher sich am besten eignet, wird die Erfahrung zeigen. Jedenfalls gelang es mit Pseudoisocyanin, gut reproduzierbare Werte zu erhalten.

Ein Nachteil der angegebenen Methode ist, daß sie nur die polyanionische Struktur der Glykosaminoglykane nachweist, nicht aber einzelne Bausteine der Moleküle.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Die von SUSCHKE (71) angegebene Methode zur quantitativen Bestimmung der Mucopolysaccharide in Körperflüssigkeiten mit Hilfe der metachromatischen Reaktion des kationischen Farbstoffes Pseudoisocyanin, wurde - unter Einbeziehung eines Ultrafiltrationsschrittes - auf die Synovialflüssigkeit übertragen.

Die Zerstörung der bei der Metachromasie störenden Proteine gelang durch zweimalige Hydrolyse (Trypsin, Pronase) und anschließende Fällung mit Sulfosalicylsäure. Die Abtrennung der Glykosaminoglykane erfolgte durch Ultrafiltration.

Durch die Bestimmung der Wiederfindungsrate konnte gesichert werden, daß bei der Abtrennung der Glykosaminoglykane diese nicht in Mitleidenschaft gezogen werden und die Proteine in genügendem Ausmaß hydrolysiert werden.

Damit ist eine Methode an die Hand gegeben, die eine Bestimmung der Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit erlaubt und so der Einfluß medikamentöser Therapie auf den Gehalt an Glykosaminoglykanen verfolgt werden kann.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. Amicon:
Ultrafiltration: Anleitungen und Katalog (1977)
2. Appel, W., G. Scheibe:
Über die Bildung reversibler Polymerisate des Pseudo-
isocyanins durch polare, kettenförmige Hochpolymere
(Heparin).
Z. Naturforsch. 13b (1958) 359 - 364
3. Balazs, E.A.:
Physical chemistry of hyaluronic acid.
Fed. Proc. 17 (1958) 1086 - 1093
4. Balazs, E.A.:
Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular
Matrix.
Vol. II, London, New York (1960) 703
5. Böldcker, K.W., H. Strahtmann:
Die Membranfiltration.
Chem. i. u. Zeit 8 (1974) 105 - 111
6. Bollet, A.J.:
The intrinsic viscosity of synovial fluid hyaluronic
acid.
J. Lab. Clin. Med. 48 (1956) 721 - 728
7. Bollet, A.J.:
Inhibition of glucosamine-6- PO_4 -synthesis by salicylate
and other anti-inflammatory agents in vitro.
Arthr. Rheum. 4 (1961) 624 - 631

8. Bollet, A.J., J.F. Goodwin, A.K. Brown:
Metabolism of mucopolysaccharides in connective tissue.
I. Studies of enzymes involved in glucuronid metabolism.
J. Clin. Invest. 38 (1959) 451 - 455
9. Bollet, A.J., A. Shuster:
Metabolism of mucopolysaccharides in connective tissue.
II. Synthesis of glucosamine-6-phosphate.
J. Clin. Invest. 39 (1960) 1114 - 1118
10. Boström, H.K., K. Bernisen, M.W. Whitehouse:
Biochemical properties of anti-inflammatory drugs.
II. Some effects on sulphate-³⁵S metabolism in vivo.
Biochem. Pharmacol. 13 (1964) 413
11. Brante, G.:
Gargolysm - a mucopolysaccharidosis.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 4 (1952) 43 - 46
12. Brettschneider, J., R. Kraus, J. Musilova, M. Adam:
Effects of some antirheumatics on connective tissue components.
Arzneimittelforsch. 26 (1976) 846 - 848
13. Brimacombe, J.S., J.M. Webber:
Mucopolysaccharides.
In: B.B.A. Library, Vol. 6, Elsevier Publishing Comp.,
Amsterdam, London, New York (1964)
14. Castor, C.W.:
Connective tissue activation.
IV: Regulatory effects of antirheumatic drugs.
Arthr. Rheum. 15 (1972) 504 - 514

15. Castor, C.W.:
Connective tissue activation.
VI. The effects of cyclic nucleotids on human synovial cells in vitro.
J. Lab. Clin. Med. 83 (1974) 46 - 55
16. Castor, C.W., E.L. Dorstweitz, S.F. Smith:
Connective tissue activation.
I. The nature, specificity, measurement, and distribution of connective tissue activating peptide.
Arthr. Rheum. 14 (1971) 41 - 54
17. Cohen, A.S., D. Kenneth, D. Brandt, P.R. Krey:
Synovial fluid.
In: Cohen, A.S. (Ed.) Laboratory diagnostic procedures in the rheumatic disease.
2nd. Ed. Little, Brown and Comp., Boston (1975)
1 - 62
18. Daltrozzo, E., G. Scheibe, K. Gschwind, F. Haimerl:
On the structure of the J-aggregates of pseudoisocyanine.
Photogr. Sci. Eng. 18 (1974) 441 - 450
19. Diakun, G.P., H. Edwards, J.C. Ellen, G.O. Phillips:
Analysis of glycosaminoglycans in urine by using acridine orange fluorescence.
Biochem. J. 175 (1978) 573 - 577
20. Dinnendahl, V., H.D. Peters, P.S. Schönhöfer:
Effects of sodium salicylate and acetylsalicylic acid on cyclic 3',5'-AMP-dependent protein kinase.
Biochem. Pharmacol. 22 (1973) 2223 - 2228

21. Edstrom, R.D.:
A colorimetric method for the determination of mucopolysaccharides and other acidic polymers.
Analyt. Biochem. 29 (1969) 421 - 432

22. Ehrlich, P.:
Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik.
Arch. Mikr. Anat. 13 (1877) 263 - 277

23. Fassbender, H.G.:
Lymphocyte infiltration and proliferation of stroma cells of synovial tissue in rheumatoid arthritis.
In: Experimental models of chronic inflammatory diseases.
Hrsg.: L.E. Glynn und H.D. Schlumberger.
Springer; Berlin, Heidelberg, New York (1977) 349 - 352

24. Field, E.J.; R.I. Harrison:
Anatomical Terms: Their Origin and Derivation.
(2nd ed.) Cambridge: Heffer (1957)

25. Finkbeiner, G.F., E. Schönhaber, G. Fries:
Erfahrungen mit Orgotein bei der konservativen Behandlung der Gonarthrose: Ergebnisse einer multizentrischen Studie.
Akt. Rheumatol. 6 (1981) 138 - 141

26. Fridovich, I.:
Superoxide dismutases.
Ann. Rev. Biochem. 44 (1975) 147 - 159

27. Goggins, J.F., G.S. Johnson, I. Pastan:
The effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on synthesis of sulfated mucopolysaccharides by transformed fibroblasts.
J. Biol. Chem. 247 (1972) 5750 - 5764

28. Greenwald, R.A., W.W. Moy:
Action of superoxide radical on hyaluronic acid.
Arthr. Rheum. 22 (1979) 616
29. Greiling, H., K. Kleesiek:
Die klinisch-chemische Synovialanalyse.
In: Folia rheumatologica der Reihe: Documenta Geigy,
Basel (1978) 1 - 16
30. Gschwind, K.:
Zur Struktur von Pseudoisocyanin-Aggregaten.
Dissertation. Technische Universität München (1974)
31. Hamerman, D., M. Schubert:
Diarthroidal Joints.
Amer. J. Med. 33 (1962) 555 - 590
32. Harper, H.A., G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss:
Physiologische Chemie.
Springer; Berlin, Heidelberg, New York (1975)
33. Harzer, K., H.U. Benz:
Quantitative Metachromasie mit Pseudoisocyanin:
Eine neue Methode zur Bestimmung von Sulfatiden so-
wie ihre Anwendung bei der Diagnose der Metachroma-
tischen Leukodystrophie (Sulfatid-Lipidose).
Zeitschr. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11 (1973)
471 - 475
34. Hyrtl:
Paracelsus.
J. Onomatologica Anatomica, Wien 1880.
35. Jelley, E.E.:
Spectral absorption and fluorescence of dyes in the
molecular state.
Nature 138 (1936) 1009 - 1010

36. Jelley, E.E.:
Molecular, nematic and crystal states of 1:1'-
diethyl-4-cyanine-chloride.
Nature 139 (1937) 631 - 632
37. Kézdy, F.J., L. Lorand, K.D. Miller:
Titration of active centers in thrombin-solutions.
Standardization of the enzyme.
Biochem. 4 (1965) 2302 - 2308
38. Krupp, P., B. Exer, R. Menassé, R. Ziel:
Neue Aspekte der Entzündungshemmung durch nicht-
steroid Antiphlogistika: Wirkung von Voltaren.
Schweiz. med. Wschr. 105 (1975) 646 - 648
39. Levine, M.J., D.H. Kling:
Rheologic studies on synovial fluid.
J. Clin. Invest. 35 (1956) 1419 - 1427
40. Lin, Y., G.E. Means, R.E. Feeney:
The action of proteolytic enzymes on N,N-Dimethyl
Proteins.
J. Biol. Chem. 244 (1969) 789 - 793
41. Mäkinen, P.:
Synovial fluid in rheumatoid arthritis.
Ann. Med. Exptl. Biol. Fennice (Helsinki)
36 (Suppl. 7) (1958) 1 - 70
42. Mann, T., D. Keilin:
Haemocuprein and hepatocuprein, copper protein
compounds of blood and liver in mammals.
Proc. of the Royal Soc. Series B 126 (1939) 303

43. McCord, J.M.:
Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase.
Science 185 (1974) 529 - 531
44. McCord, J.M., K. English, W.F. Petrone:
A role for superoxide in granulocyte mediated inflammation.
In: Biological and clinical Aspects of Superoxide and Superoxide Dismutase.
Developments in Biochemistry (Bannister, W.H., J. V. Bannister, Eds.),
Elsevier, New York - Amsterdam - Oxford 11 B (1980)
154
45. Meyer, K.:
The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 6 (1938) 91 - 102
46. Michelacci, Y.M., C.P. Dietrich:
Structure of chondroitin sulfates. Analysis of the products formed from chondroitin sulfates A and C by the action of the chondroitinases C and AC from flavobacterium heparinum.
Biochim. Biophys. Acta, 451 (1976) 436 - 443
47. Muir, H.:
The structure and metabolism of mucopolysaccharides (glycosaminoglycans) and the problem of the mucopolysaccharidoses.
Amer. J. Med. 47 (1969) 673 - 690

48. Nomoto, M., Y. Narahashi:
A proteolytic enzyme of streptomyces griseus.
IV. General properties of Streptomyces griseus protease.
J. Biochem. (Japan) 46 (1959) 1645 - 1651

49. Papaioannou, S., I.E. Liener:
A simple chromatographic procedure for enhancing
the purity of commercial preparations of crystalline
trypsin.
J. Chromatogr. 32 (1968) 746 - 748

50. Pennock, C.A.:
A review and selection of simple laboratory methods
used for the study of glycosaminoglycan excretion
and the diagnosis of the mucopolysaccharidoses.
J. Clin. Pathol. 29 (1976) 111 - 123

51. Peters, H.D., V. Dinnendahl, P.S. Schönhöfer:
Mode of action of antirheumatic drugs on the cyclic
3',5'-AMP regulated glycosaminoglycan secretion in
fibroblasts.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 289 (1975)
29 - 40

52. Peters, H.D., K. Karzel, D. Padberg, P.S. Schönhöfer,
V. Dinnendahl:
Influence of prostaglandin E₁ on cyclic 3',5'-AMP
levels and glycosaminoglycan secretion of fibroblasts
cultured in vitro.
Pol. J. Pharmacol. Pharm. 26 (1974) 41 - 49

53. Petrone, W.F., D.K. English, K. Wong, J.M. McCord:
Free radicals and inflammation: Superoxide-dependent
activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma.
Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) USA 77 (1980) 1159

54. Rampini, S.U.:
Klinik der Mukopolysaccharidosen.
In: Vivell, O. und W. Burmeister (Hrsg.)
Bücherei des Pädiaters, Heft 74,
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1976)
55. Rosenbeck, H.:
Untersuchungen zur Dünnschichtchromatographie saurer
Mucopolysaccharide bei Kindern mit Mucopolysacchari-
dosen.
Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München
(1973)
56. Rosenfeld, L.:
Quantitative levels of the constituents of acid muco-
polysaccharides and other carbohydrate polymers in
dialyzed normal human urine.
Clin. Chim. Acta 31 (1971) 263 - 269
57. Ross, R., N.B. Everett, R. Tyler:
Wound healing and collagen formation.
VI. The origin of wound fibroblasts studies in para-
biosis.
J. Cell. Biol. 44 (1970) 645 - 654
58. Rotilio, G., R.G. Bray, E.M. Fielden:
A pulse radiolysis study of superoxide dismutase.
Biochim. Biophys. Acta 268 (1972) 605
59. Sasakawa, S., K. Satake:
Hemoglobin. IV. Histidine peptides derived from horse
globin with Streptomyces griseus proteinase.
J. Biochem. (Japan) 47 (1960) 672 - 677

60. Scheibe, G.:
Über die Veränderlichkeit der Absorptionsspektren
in Lösung und die van der Waals'schen Kräfte als
ihre Ursache.
Angew. Chem. 50 (1937) 51
61. Scheibe, G.:
Reversible Polymerisation als Ursache neurartiger
Absorptionsbanden von Farbstoffen.
Kolloid. Z. 82 (1938) 1 - 14
62. Schönhöfer, P.S., H.D. Peters, K. Karzel, V. Dinnen-
dahl, P. Westhofen:
Influence of antiphlogistic drugs on prostaglandin
E₁ stimulated cyclic 3',5'-AMP levels and glycosamino-
glycan synthesis in fibroblasts tissue cultures.
Pol. J. Pharmacol. Pharm. 26 (1974) 51 - 60
63. Schwert, G.W., J. Takenaka:
A spectrophotometric determination of trypsin and
chymotrypsin.
Biochim. Biophys. Acta 16 (1955) 570 - 575
64. Scott, J.E., D.J. Newton:
The recovery and characterization of acid glycosamino-
glycans in normal human urine. Influence of a cir-
cadian rhythm.
Connect. Tissue Res. 3 (1975) 157 - 164
65. Seppälä, P.O., J. Kärkkäinen, A. Lethonen, P. Mäkisara:
Chondroitin sulphate in the normal and rheumatoid
synovial fluid.
Clin. Chim. Acta 36 (1972) 549 - 553

66. Snider, D.E. jr., C.W. Parker:
Lower lymphocyte cyclic-AMP levels after aspirin.
New Engl. J. Med. 292 (1975) 809 - 810
67. Stafford, C.T., W. Niedermeier, H.L. Holley, W. Pigmon:
Studies on the concentration and intrinsic viscosity
of hyaluronic acid in synovial fluids of patients with
rheumatic diseases.
Ann. rheum. Dis. 23 (1964) 152 - 157
68. Stuhlsatz, H.W., A. Eberhard, H. Kirstin, O. Vojtisek,
H. Greiling:
Die Glykosaminoglykane in der Synovialflüssigkeit bei
chronischen Gelenkserkrankungen.
Verh. Dtsch. Ges. Rheumatol. 4 (1976) 444 - 454
69. Sundblad, L.:
Studies on hyaluronic acid in synovial fluids.
Acta Soc. med. Upsaliensis 58 (1953) 113 - 238
70. Sundblad, L.:
Glycosaminoglycans and Glycoproteins in Synovial Fluid.
In: The Aminosugars Vol. II A (Eds.: Balazs, E.A.,
R.W. Jeanloz), Academic Press, New York (1965) 229 - 250
71. Suschke, H.J.:
Bestimmung und Bedeutung saurer Mucopolysaccharide
im menschlichen Urin und Fruchtwasser.
Habilitationsschrift, Ludwig-Maximilians-Universität
München (1971)
72. Suschke, H.J.:
Saure Mucopolysaccharide im Urin, Fruchtwasser und
Serum.
Fortschr. Med. 91 (1973) 485 - 487

73. Suschke, H.J.; A. Foldenauer:
Resorption oral gegebener Heparinoide?
Münch. Med. Wschr. 48 (1969) 2517 - 2519
74. Suschke, H.J., A. Foldenauer:
Die quantitative Bestimmung saurer Mucopolysaccharide
im Harn als Grundlage der Resorptionsprüfung oral ge-
gebener Heparinoide.
Schw. Med. Wschr. 100 (1970) 745 - 748
75. Suschke, H.J., D. Kunze:
Zur quantitativen Bestimmung saurer Mucopolysaccharide
im menschlichen Fruchtwasser.
Münch. Med. Wschr. 113 (1971) 1495 - 1496
76. Suschke, H.J., H. Rosenbeck, K. Kreijci, D. Kunze:
Mucopolysaccharidosen: dünnschichtchromatographische
Differenzierung saurer Mucopolysaccharide.
diagnostik 7 (1974) 318 - 322
77. Suschke, H.J., D. Vogt:
Über den metachromatischen Nachweis von Heparinoiden
im Urin.
Dtsch. Med. Wschr. 94 (1969) 547 - 549
78. Suschke, H.J., D. Vogt, B. Becker, R. Vierling:
Neuere Ergebnisse zur quantitativen Mucopolysaccharid-
bestimmung mit einer empfindlichen Metachromasie-
Methode.
Arch. Kinderheilk. 180 (1969) 28 - 37
79. Suschke, H.J., D. Vogt, P. Scheibe:
Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung saurer
Mucopolysaccharide im Harn.
Fortschr. Med. 85 (1967) 911 - 912

80. Tanigushi, N., T. Okamoto, N. Okuda:
Subunit structure of isomeric chondroitin sulfates
from normal humane urine.
Biochem. Med. 15 (1976) 169 - 177

81. Teller, W.:
Die Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im mensch-
lichen Harn.
Mschr. Kinderheilk. 112 (1964) 538 - 546

82. Tsugita, A., S. Akabori:
The structure of glycopeptides obtained from Taka-
Amylase.
J. Biochem. (Japan) 46 (1959) 695 - 704

83. Utikal, H.P.:
Einfache quantitative Bestimmung der Glykosamino-
glykane im Urin mit Pseudoisocyanin.
Dissertation (in Vorbereitung), Ludwig-Maximilians-
Universität München (1981/82)

84. Walcher, W.:
Praktikum der Physik.
B. G. Teubner Verlag, Stuttgart (1966) 31

85. Wasserman, L., A. Ber, D. Allalouf:
Use of thin-layer chromatography in the separation
of disaccharides resulting from digestion of chondroitin
sulphates with chondroitinases.
J. Chromatogr. 136 (1977) 342 - 347

86. Whitehouse, M.W., H. Boström:
Studies on the action of some anti-inflammatory agents
in inhibiting the biosynthesis of mucopolysaccharide
sulphates.
Biochem. Pharmacol. 7 (1961) 135 - 150

87. Whiteman, P.:

The quantitative determination of glycosaminoglycans
in urine with alcian blue 8GX.

Biochem. J. 131 (1973) 351 - 357

Herrn Prof. Dr. med. H.J. Suschke bin ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Nicht zuletzt danke ich herzlichst den Patienten, die mir das Untersuchungsmaterial zur Verfügung stellten.

Lebenslauf

Am 25. Juni 1948 wurde ich in München als einziges Kind des Mechanikers Friedrich Manz und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Oklmann, geboren.

Ab September 1954 besuchte ich die Volksschule in Münöhen und trat 1959 auf das Erasmus-Grasser-Gymnasium, ebenfalls in München, über, wo ich am 23. Juli 1968 das Reifezeugnis überreicht bekam.

Vom Wintersemester 1968/69 an studierte ich an der Technischen Universität zu München das Fach Chemie und erlangte am 10. Januar 1974 den akademischen Grad eines Diplomchemikers mit einer Arbeit "Über das Reaktionsverhalten von Nitril-Yliden verschiedener Provenienz gegenüber Acrylsäureestern".

Anschließend war ich zwei Jahre am Organisch-Chemischen Institut der TU München als wissenschaftlicher Assistent tätig. Im Sommersemester 1975 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München auf, welches ich im April 1981 erfolgreich abschloß. Seit dem 12. Mai 1981 bin ich approbierter Arzt.

München, im September 1981

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Passagen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

München, den 7. September 1981

